

Original Article

Creation of Tenecteplase-Producing CHO Cell Line Using Site-Specific Integrase from the Phage ϕ C31

Kianoush Dormiani, Pharm.D.^{1,2}, Yahya Khazaie, Pharm.D.¹, Mahboobeh Forouzanfar, B.Sc.¹, Kamran Ghaedi, Ph.D.^{1,3*}, Mohammad Reza Mofid, Ph.D.⁴, Khadijeh Karbalaie, M.Sc.⁵, Fereshteh Karamali, M.Sc.⁵, Michele P. Calos, Ph.D.⁶, Mohammad Hossain Nasr Esfahani, Ph.D.^{1*}

1. Molecular Biotechnology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Pharmaceutical Biotechnology Department, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Biology Department, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Biochemistry Department, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5. Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
6. Genetics Department, Stanford University, School of Medicine, Stanford, California, USA

* Corresponding Addresses: P.O.Box: 19395-4644, Molecular Biotechnology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 2/Sep/2009, Accepted: 23/Feb/2010

Abstract

Objective: The aim of this study was to produce a stable CHO cell line expressing tenecteplase.

Materials and Methods: In the first step, the tenecteplase coding sequence was cloned in a pDB2 vector containing attB recognition sites for the phage ϕ C31 integrase. Then, using lipofection, the CHO cells were co-transfected with constructed recombinant plasmid encoding tenecteplase and attB recognition sites and the integrase coding sequence containing pCMV-Int plasmid. As the recombinant plasmid contained the neomycin resistance gene (neo), stable cells were then selected using G418 as an antibiotic. Stable transformed cells were assessed using genomic PCR and RT-PCR. Finally, the functionality of tenecteplase was evaluated on the cell culture media.

Results: our results indicated that tenecteplase coding sequence was inserted into the CHO cell genome and was successfully expressed. Moreover, tenecteplase activity assessment indicated the presence of our functional tenecteplase in the cell culture medium.

Conclusion: Considering the data obtained from this study, ϕ C31 integrase can be used for the production of a stable cell line and it be used to introduce ectopic genes into mammalian cells.

Keywords: Tenecteplase, Integrase, Pubmed, CHO

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 207-214

تولید رده سلولی CHO مولد Tenecteplase با استفاده از اینترگراز اختصاصی فاز C31 ϕ

کیانوش درمیانی^۱، Pharm.D.^۲، یحیی خزائی^۳، Pharm.D.^۴، محبوبه فروزانفر^۵، B.Sc.^۶، کامران قائدی^۷، Ph.D.^۸،
محمد رضا مفید^۹، Ph.D.^{۱۰}، خدیجه کربلایی^{۱۱}، M.Sc.^{۱۲}، فرشته کرملی^{۱۳}، M.Sc.^{۱۴}، میشله کالوس^{۱۵}، Ph.D.^{۱۶}،
محمد حسین نصر اصفهانی^{۱۷}، Ph.D.^{۱۸}*

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه بیوتکنولوژی مولکولی، اصفهان، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوشیمی، اصفهان، ایران
۵. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، اصفهان، ایران
۶. دانشگاه استنفورد، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک، استنفورد، آمریکا

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، اصفهان، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

پست الکترونیک: Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۸/۶/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۴

چکیده

* **هدف:** تولید پایدار پروتئین Tenecteplase توسط رده سلولی CHO

* **مواد و روش‌ها:** توالی کدکننده Tenecteplase - که قبلاً تهیه شده است - در یک حامل بیانی به نام pDB2 دارای توالی قابل شناسایی توسط آنزیم اینترگراز فاز C31 ϕ موسوم به attB کلون گردید. این حامل نوترکیب به همراه یک پلاسمید کدکننده اینترگراز C31 ϕ به نام pCMV-Int به طور هم‌زمان طی یک فرایند لیپوفکشن به یک رده سلولی CHO منتقل گردید. با توجه به ساختار پلاسمید pDB2 که دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نووماسین (Neo^r) می‌باشد، سلول‌ها با آنتی‌بیوتیک G418 غربالگری گردیدند تا رده‌های سلولی نوترکیب به دست آید. سپس نوترکیب بودن رده‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا الحاق پایدار توالی کدکننده Tenecteplase ژنوم میزبان با آزمون PCR ژنومی و بیان پروتئین با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت آزمون بررسی فعالیت Tenecteplase نوترکیب ترشح شده در محیط کشت سلولی مورد نظر انجام گردید.

* **یافته‌ها:** آزمون PCR ژنومی الحاق قطعه مورد نظر را به ژنوم میزبان نشان داد و همین‌طور آزمون RT-PCR بیان پروتئین Tenecteplase را ثابت نمود. آزمون بررسی فعالیت وجود مقادیر قابل توجه پروتئین را در محیط کشت نشان داد.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به دست آوردن رده پایدار مولد پروتئین نوترکیب Tenecteplase می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سامانه اینترگراز فاز C31 ϕ می‌تواند به صورت هدفمند، یک قطعه DNA خارجی را در مکان‌های مشخصی از ژنوم سلول میزبان الحاق نماید و بنابراین جهت تهیه رده‌های نوترکیب سلول‌های پستانداران می‌تواند بسیار مناسب باشد.

* **کلیدواژگان:** Tenecteplase، اینترگراز، CHO

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۱۴-۲۰۷

مقدمه

فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) یک آنزیم دارای چندین دامنه (Domain) از خانواده سرین پروتئازها می‌باشد که نقش فیزیولوژیک آن تبدیل پلاسمینوژن به شکل فعال آن یعنی پلاسمین است (۱). این آنزیم جهت آغاز یا تسهیل فرایند انحلال لخته (فیبرینولیز) ضروری است. با توجه به این ویژگی، t-PA به عنوان یک دارو در کلینیک در درمان نارسایی‌های ترومبوتیک حاد مثل انفارکتوس میوکارد مورد استفاده قرار گرفته است (۴-۲).

موتاسیون‌های هدفمند زیادی بر روی مولکول فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انجام شده است که هدف از آن، افزایش درجه اختصاصی بودن آن نسبت به فیبرین و همچنین بهبود خصوصیات

فارماکوکینتیک آن بوده است. از میان تمام مطالعات انجام شده، یک مولکول به نام Tenecteplase دارای ویژگی‌های برتری نسبت به مولکول t-PA بوده است که فرآورده دارویی حاصل از آن به بازار راه پیدا نمود. در مولکول Tenecteplase موتاسیون بر روی دامنه پروتئازی با جانشین کردن چهار آلانین به جای اسیدآمینه‌های ۲۹۶ تا ۲۹۹ ایجاد گردید که باعث شد درجه اختصاصی بودن نسبت به فیبرین افزایش یابد. همچنین ترئونین ۱۰۳ با آسپاراژین جایگزین شد تا پروتئین در خون از کلیترانس آهسته‌تر و در نتیجه از نیمه عمر طولانی‌تری برخوردار گردد. موتاسیون آخر در موقعیت اسیدآمینه ۱۱۷ انجام گرفت که در آن گلوتامین به جای آسپاراژین جایگزین گردید. این موتاسیون، کاهش فعالیت فیبرینولیتیک ایجاد شده توسط

تولید رده سلولی CHO مولد Tenecteplase

توالی کدکننده Tenecteplase با واکنش PCR استفاده گردید.
توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

Forward primer: 5'cgaggctagcatggatgcaatgaagagagggc 3'
Reverse primer: 5' ggctcagtgacggctcgcatgtgtcagc 3'

پرایمرهای این واکنش به گونه‌ای طراحی شدند که محل برش آنزیم محدود کننده *XhoI* را در پایین دست و محل برش آنزیم محدود کننده *NheI* را در بالا دست توالی محصول قرار دادند.

همچنین شرایط انجام PCR به شرح زیر بود: ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۴ درجه و متعاقب آن ۳۰ سیکل تکثیر (۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۲ دقیقه) و در پایان ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۷۲ درجه.

محصول PCR توسط کیت Qiagen (Germany) از روی ژل، استخراج و خالص سازی شد و طبق دستورالعمل مربوطه به کیت T/A Cloning (Fermentas) در حامل pTZ57R کلون گردید. واکنش الحاق با استفاده از کیت DNA Ligation Kit (Takara) انجام شد. محصول واکنش کلونینگ در باکتری *E. coli* پذیرا از نوع شیمیایی به نام One Shot Top10 (Invitrogen) ترانسفورم گردید. کلونی‌های صحیح با فرایند غربالگری سفید/آبی بر روی پلیت LB آگار انتخاب گردیدند و چند کلونی به صورت خالص تکثیر و پلاسمید آنها استخراج و جهت تعیین توالی ارسال گردید. پلاسمید نوترکیب تحت تیمار دوگانه با آنزیم‌های *XhoI* و *NheI* قرار گرفت که با برش این حامل نوترکیب، قطعه کدکننده Tenecteplase بریده شده بر روی ژل، مشاهده و از روی ژل با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) خالص سازی گردید.

کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase در حامل بیانی pDB2

در این مطالعه پلاسمید pDB2 جهت کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید که از طرف پروفیسور کالوس از دانشگاه استنفورد اهدا شده بود، حاوی یک محل برش برای هر یک از آنزیم‌های *XhoI* و *NheI* بوده است (۱۱). در ابتدا این پلاسمید با این دو آنزیم به طور هم‌زمان تیمار گردید. جایگاه برش هر دو آنزیم در پایین دست پروموتور سایتومگالوویروس (CMV) و در بالادست توالی *attB* موجود می‌باشد به گونه‌ای که قطعه الحاق شونده می‌تواند بین پروموتور و جایگاه *attB* قرار گیرد (شکل ۱).

پلاسمید بریده شده که دارای دو انتهای چسبناک بود، توسط کیت تخلیص از ژل از روی ژل استخراج و خالص سازی گردید. سپس Tenecteplase خالص شده در مرحله قبل با انجام واکنش الحاق (Ligation) در پلاسمید pDB2 خالص شده کلون گردید. محصول واکنش الحاق در باکتری *E. coli* پذیرا ترانسفورم گردید سپس کلونی‌های صحیح با فرایند کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر توالی کامل Tenecteplase غربالگری شدند. چند کلونی باکتریایی صحیح، انتخاب و تکثیر شدند و پلاسمید نوترکیب pDB2/Tenecteplase جهت مطالعات بعدی توسط کیت QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) خالص سازی گردید.

دو موتاسیون قبلی را جبران نمود (۵).

در این مطالعه توالی کدکننده Tenecteplase - که قبلاً تهیه شده بود - با استفاده از سامانه اینتگرز فاژ ϕ C31 به ژنوم رده سلولی CHO الحاق گردید. اینتگرز ϕ C31 - که یک سرین رکامیناز است - توسط باکتریو فاژ استریپتومایسس موجود در خاک کد می‌گردد (۶، ۷). این اینتگرز قادر است توالی‌های مشخصی موسوم به جایگاه‌های *att* با طولی حدود ۳۰ جفت باز را شناسایی و الحاق را در جایگاه‌های یاد شده انجام دهد. این اینتگرز، *att* فاژ (موسوم به *attP*) را شناسایی نموده و آن را به طور اختصاصی به جایگاه *att* در ژنوم باکتری استریپتومایسس (با نام *attB*) الحاق می‌کند. این دو توالی با یکدیگر متفاوتند و تنها در ۵۰ درصد ردیف نوکلئوتیدی خود شبیه هستند. بعد از پایان واکنش، هیبریدهای ایجاد شده در طرفین قطعه الحاق شده (موسوم به *attL* و *attR*) توسط آنزیم، قابل برش نیستند. بنابراین در این واکنش، الحاق یک طرفه و پایدار است (۸). این اینتگرز می‌تواند جایگاه‌هایی شبیه به *att* در ژنوم سایر موجودات مثل پستانداران را شناسایی نماید. از آنجایی که این جایگاه‌ها *att* کاذب (*Pseudo att site*) نام گرفتند، کارا بودن این سامانه در رده‌های سلولی پستانداران نیز مورد آزمون و تایید قرار گرفت. بنا بر این جهت استفاده از این آنزیم، باید توالی *attB* مورد شناسایی اینتگرز ϕ C31 را در یک پلاسمید در کنار توالی DNA مورد نظر قرار داده و این پلاسمید را به همراه پلاسمید دیگری - که بیان کننده آنزیم اینتگرز ϕ C31 تحت عملکرد یک پروموتور یوکاریوتی باشد - به صورت هم‌زمان به درون سلول‌های رده مورد نظر انتقال داد (Co-Transfection). وقتی در داخل سلول اینتگرز بیان شود، می‌تواند جایگاه‌های شبه *attP* (*pseudo attP*) را در ژنوم میزبان شناسایی نموده و پلاسمید حاوی توالی کلون شده را در محل توالی *attB* بریده و به جایگاه *pseudo attP* الحاق نماید (۹).

ابتدا در این مطالعه توالی کدکننده Tenecteplase در پلاسمیدی موسوم به pDB2 دارای توالی *attB* کلون گردید. سپس این پلاسمید که در عین حال دارای توالی ایجاد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک G418 نیز می‌باشد، به همراه پلاسمید دیگری - که بیان کننده اینتگرز ϕ C31 است - به صورت توامان در سلول‌های CHO با روش لیپوفکشن ترانسفکت شد. غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده بر مبنای مقاومت به آنتی‌بیوتیک انجام و سایر بررسی‌ها بر روی رده‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

کلون نمودن توالی کدکننده Tenecteplase در حامل از نوع T

از قبل توالی کدکننده Tenecteplase طی چندین مرحله واکنش‌های ایجاد موتاسیون هدفمند با روش Site Directed Mutations by Means of Mutagenic Mega-Primers در پژوهشکده رویان ساخته شد (۱۰) و صحت توالی آن مورد تایید قرار گرفت. سپس در یک حامل از نوع T تحت عنوان pTZ57R (Fermentas) طی فرایند T/A کلونینگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده کلون گردید. از این حامل به عنوان الگو برای تکثیر

آوردن سلول‌های پایدار آنتی‌بیوتیک (Sigma) G418 با غلظت نهایی ۶۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌های مذکور افزوده شد. در نهایت پس از ۱۱ روز، ۱۲ کلونی سلولی مقاوم انتخاب و جدا شدند (Colony Pick Up) و هر کدام به یک چاهک از پلیت ۱۲ خانه منتقل گردیدند. پس از حدود ۷ روز که سلول‌های هر چاهک تکثیر شده و به تراکم نزدیک به ۱۰۰ درصد رسیدند، سلول‌های هر چاهک پاساژ داده شد تا آزمون‌های بعدی روی آنها انجام گیرد.

تایید کلونی‌های ترانسفکت شده پایدار از نظر دارا بودن توالی بیان کننده Tenecteplase

جهت بررسی کلونی‌های رشد یافته در حضور آنتی‌بیوتیک از دو آزمایش جداگانه بهره گرفته شد:

۱. PCR ژنومی: از فلاسک مفروش به سلول‌های غربال‌گری شده، سلول‌ها با تیمار به وسیله تریپسین جدا شده و پس از شست‌وشو، ژنوم حدود 6×10^5 سلول توسط کیت (Qiagen) Dneasy® Blood & Tissue Kit استخراج گردید و با پرایمرهای مخصوص تکثیر Tenecteplase (با شرایط ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد که متعاقب آن ۳۵ سیکل تکثیر (۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه) و در پایان ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی پرایمرهای واکنش فوق به شکل زیر می‌باشد:

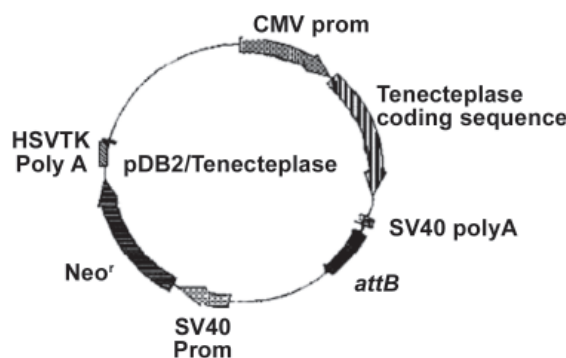
Forward primer: 5' ggctcgcagatggatgcaatgaagaggggct 3'
Reverse primer: 5' ggctcgcagtcacggtcgcatgtgtcagc 3'

۲. RT-PCR: ۲ میکروگرم RNA Total استخراج شده از 2×10^6 سلول نو ترکیب جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی با آنزیم DNase I به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار و از آن برای سنتز cDNA استفاده گردید. برای سنتز cDNA از کیت و پرایمرهای تصادفی شش نوکلئوتیدی (primer) Random Hexamer شرکت Fermentas استفاده شد و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت فوق صورت گرفت. پس از آن واکنش PCR با ۵ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱۰ پیکومول پرایمرهای مربوطه و $1/25$ واحد آنزیم پلیمرز *Smartaq* (Cinnagen) با برنامه دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام مرحله پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Thermal Cycler Eppendorf انجام شد. توالی پرایمرهای واکنش فوق عبارتند از:

Forward primer: 5' tgcaccaactggcagagcagcgctgtg 3'
Reverse primer: 5' gctctcggggcagggcggcgggcgggcggcaaatgatggca 3'

آزمون‌های مورد استفاده جهت بررسی پروتئین نو ترکیب ترشح شده در محیط کشت

۱. مشاهده باند پروتئین بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید جهت بررسی وجود پروتئین Tenecteplase در محیط کشت و اثبات ترشح این پروتئین، آزمون الکتروفورز عمودی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام شد. جهت این کار از ژل Resolving ۱۲ درصد استفاده گردید و نمونه‌ها (جدول ۲) بر روی ژل قرار داده شدند و در نهایت پس از انجام الکتروفورز، ژل مذکور با نیترات نقره



شکل ۱: پلاسمید بیانی pDB2 که توالی کدکننده Tenecteplase که در پایین دست پروموتور CMV الحاق گردیده است.

کشت سلولی و لیپوفکشن سلول‌های CHO با پلاسمید نو ترکیب

رده سلولی CHO از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌های CHO در محیط کشت Ham's F12 (Sigma) حاوی ۱۰ درصد FCS (Gibco) در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. پس از مفروش شدن کف فلاسک، سلول‌ها به کمک (Gibco) Trypsin/EDTA از کف پلیت جدا شده و پس از شمارش سلولی، تعداد $1/6 \times 10^4$ سلول در چند خانه پلیت ۲۴ خانه که از قبل لامل‌گذاری شده بودند، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد کف دیش را پر کردند، جهت آزمایش ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش از دو پلاسمید pCMV-Int و pDB2/Tenecteplase حاوی cDNA کدکننده آنزیم اینتگراز (دانشگاه استنفورد) استفاده گردید. جهت انجام ترانسفکشن ابتدا ۵۰ میکرولیتر محیط کشت (Gibco) Opti-MEM I حاوی $0/4$ میکروگرم پلاسمید pDB2/Tenect-eplase (محلول پلاسمید) به همراه ۴۰۰ میکروگرم پلاسمید pCMV-Int و ۵۰ میکرولیتر محلول Opti-MEM I حاوی ۲۰۰۰ میکرولیتر Lipofectamine (Invitrogen) تهیه گردید. پس از انکوباسیون دو محلول در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، این دو محلول با یکدیگر مخلوط شدند (محلول ترانسفکشن) و این محلول به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محیط کشت سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها به آرامی با استفاده از محیط کشت Opti-MEM I فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک شست‌وشو داده شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محیط Opti-MEM I به هر خانه اضافه شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محلول ترانسفکشن به آرامی به هر خانه اضافه گردید. سلول‌های مذکور به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. پس از آن محیط ترانسفکشن حذف و محیط کشت Ham's F12 حاوی ۱۰ درصد FCS به هر خانه اضافه و سلول‌ها برای ادامه کشت به انکوباتور منتقل گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکت شده با Trypsin/EDTA تیمار گردید و از کف پلیت جدا گردیدند و پس از شست‌وشو و شمارش، تعداد ۵۰۰۰ عدد سلول به یک پتری‌دیش ۱۰ میلی‌لیتری (Falcon, USA) منتقل شدند. جهت غربال‌گری و به دست

رنگ آمیزی گردید.

۲. آزمون Western Blot

آزمون Western Blot با آنتی بادی اولیه از نوع Sheep IgG موسوم به TPA Tissue Plasminogen Activator Antibody [2A153] (ab21049) از شرکت Abcam با غلظت اولیه ۱۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. پس از انجام آزمون Dot blot و مشاهده نتیجه، تصمیم گرفته شد تا این آنتی بادی یک بار به نسبت ۱ به ۱۶۰۰۰۰ و یک بار به نسبت ۱ به ۲۵۶۰۰۰ رقیق شده و در آزمون Western Blot به کار گرفته شود. آنتی بادی ثانویه تحت عنوان Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از شرکت DAKO با غلظت ۱ به ۵۰۰۰ در آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

۳. بررسی فعالیت Tenecteplase ترشح شده در محیط کشت

برای بررسی فعالیت پروتئین ترشح شده در محیط کشت، از یک سوبسترا به نام H-D-Isoleucyl-L-propyl-L-arginine-p-ni-troaniline dehydrate با نام تجاری S-2288 (Chromogenix) استفاده گردید. این سوبسترا اگر در معرض یک آنزیم پروتئولیتیک قرار گیرد، هیدرولیز شده و پارانیتروانیلین زرد رنگ آزاد می کند. میزان جذب نوری رنگ زرد حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر با میزان

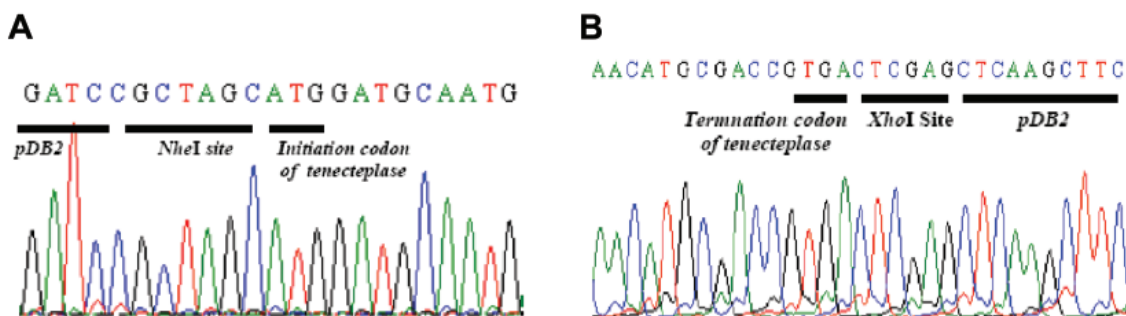
فعالیت آنزیم در محیط نسبت مستقیم دارد.

سوبسترا با غلظت ۱۰ میلی مولار بر لیتر، بافر با ترکیب ۱۰۰ میلی مولار بر لیتر تریس و ۱/۶ میلی مولار بر لیتر کلرید سدیم و محیط کشت رویی پلیت مفروش به سلول های نو ترکیب با تراکم حدود ۹۰ درصد تهیه و با نسبت حجمی مساوی با یکدیگر به خوبی مخلوط شدند. از مخلوط فوق به اندازه ۱۰۰ میکرو لیتر به یک چاهک پلیت ۹۶ خانه مخصوص خوانش با دستگاه الیزا منتقل شد. عین همین مخلوط نیز با محیط کشت رویی پلیت مفروش به سلول های CHO غیر ترانسفکت با تراکم حدود ۹۰ درصد به عنوان کنترل منفی تهیه شده و ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهک پلیت مذکور منتقل گردید. جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شده و سپس پلیت به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

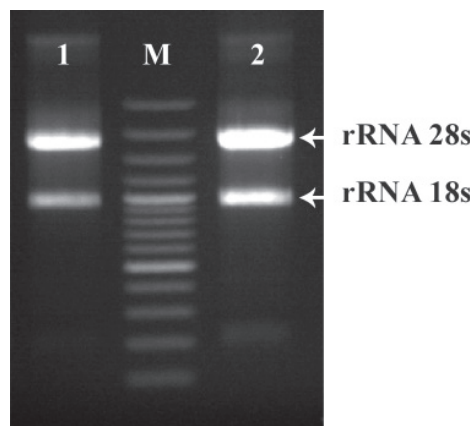
یافته ها

بررسی حامل نو ترکیب pDB2 کدکننده Tenecteplase

به دنبال کلونینگ cDNA کدکننده Tenecteplase در داخل حامل بیانی pDB2 ترادف یابی این حامل نشان داد که توالی کدکننده Tenecteplase در جایگاه مورد انتظار و بدون هر گونه جهش ناخواسته وارد شده است (شکل ۲).



شکل ۲: جایگاه های الحاق توالی Tenecteplase در حامل pDB2 (A, B) نمایش قطعاتی از ترادف های وکتور نو ترکیب pDB2 که محل الحاق توالی کدکننده Tenecteplase را در حامل pDB2 نشان می دهد. در شکل محل برش NheI (gctagc) (شکل ۲A) قبل از کدون آغازین atg و همین طور NheI محل برش XhoI (ctcgag) (شکل ۲B) بعد از کدون خاتمه tga مشخص شده است.



شکل ۳: ۱,۲) استخراج شده از سلول های CHO نو ترکیب پس از ۵ پاساژ. پیکان در این شکل نشان دهنده باندهای RNA ریبوزومی 28S، 18S می باشد. (M) نشانگر DNA. وجود این نشانگر جنبه مقایسه ای نداشته و تنها نمایانگر کیفیت بالای ژل مورد آزمایش است.

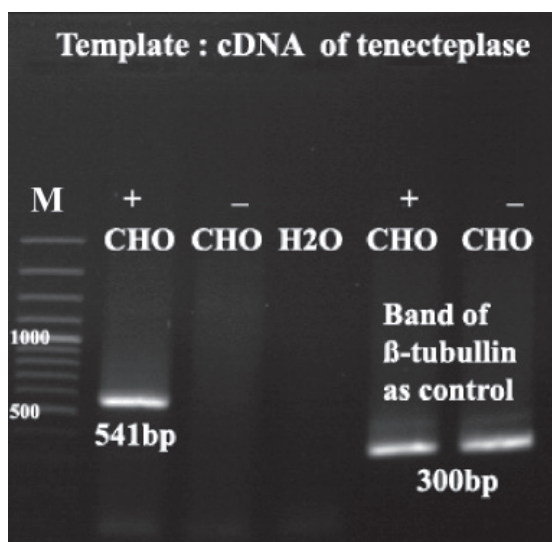
نو ترکیب به اثبات رسید (شکل ۴).

بررسی ژنومی سلول‌های CHO نو ترکیب به منظور اطمینان از ورود cDNA Tenecteplase به داخل ژنوم سلول‌های CHO ترانسفکت شده، PCR بر روی ژنوم سلول‌های ترانسفکت شده (CHO نو ترکیب) و ترانسفکت نشده صورت گرفت که به وضوح تایید کننده آزمایشات قبلی بود (شکل ۵).

جدا نمودن Total RNA سلول و انجام آزمون RT-PCR

پس از استخراج total RNA از سلول‌های CHO نو ترکیب توسط کیت، یک نمونه از آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید که نتیجه در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد. در این شکل باندهای RNA ریبوزومی 18S، 28S به وضوح دیده می‌شود و عدم وجود باندهای دیگر نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده می‌باشد (شکل ۳).

به دنبال تخلیص RNA، و سنتز RT-PCR، cDNA و تکثیر قسمتی از cDNA مربوط به Tenecteplase بیان آن در سلول‌های CHO



شکل ۴: باند با اندازه 541bp مربوط به بیان cDNA Tenecteplase را در سلول‌های CHO نو ترکیب (CHO⁺) نشان می‌دهد. PCR انجام شده بر روی CHO ترانسفکت نشده (CHO⁻) به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه حاوی آب نیز به عنوان کنترل منفی جهت بررسی آلودگی احتمالی در PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱: نوع و مقدار نمونه‌های قرارداده شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در شکل ۶

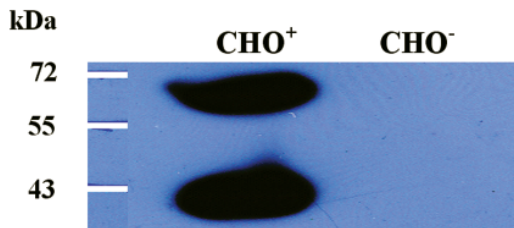
شماره در تصویر	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
نام نمونه	نمونه پروتئین استخراج شده از حدود 2×10^6 سلول نو ترکیب	نمونه پروتئین استخراج شده از حدود 2×10^6 عدد سلول غیرنو ترکیب	Ladder (Fermentas)	t-PA استاندارد 40 IU/ml	نمونه خالص شده با دستگاه FPLC از محیط کشت سلول نو ترکیب	محیط کشت HAMS-F12 با FCS ۵ درصد از سلول‌های نو ترکیب	محیط کشت HAMS-F12 با FCS ۵ درصد از سلول‌های غیرنو ترکیب
مقدار قرارداده شده بر روی ژل	۱۰ میکرولیتر محتوی ۲۹/۵ میکروگرم پروتئین	۱۰ میکرولیتر محتوی ۲۹/۵ میکروگرم پروتئین	۲ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر

جدول ۲: میزان جذب نمونه‌های برداشت شده از محیط کشت CHO در ۴۰۵ نانومتر

زمان اندازه‌گیری جذب	میزان جذب	
	محیط کشت CHO نو ترکیب	محیط کشت CHO غیرنو ترکیب
در زمان صفر	۰/۴۹۳	۰/۳۳۷
پس از یک ساعت	۲/۸۱۹	۰/۶۳۶
پس از دو ساعت	۳/۱۴۹	۰/۸۸

تولید رده سلولی CHO مولد Tenecteplase

۴۰۵ نانومتر جذب نشان می‌دهد در نتیجه در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده هم فعالیت قابل مشاهده می‌باشد. با این وجود در عمل سلول‌های ترانسفکت شده تفاوت جذب مشخصی را نشان می‌دهند.



شکل ۷: آزمون‌های Western Blot بر روی نمونه‌های محیط کشت حاوی سلول‌های CHO نو ترکیب (CHO⁺) و غیرنو ترکیب (CHO⁻) است.

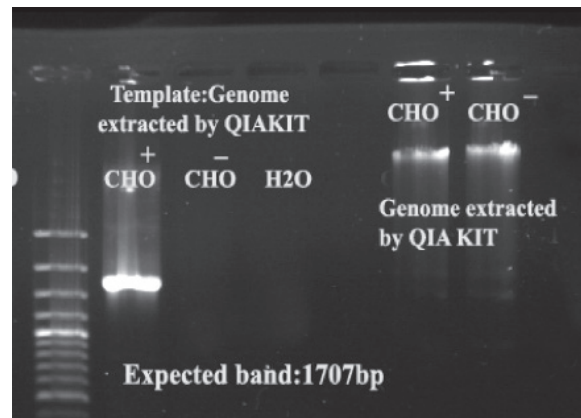
بحث

پروتئین‌های نو ترکیب در تحقیقات پایه، کاربردی و نیز درمان، کاربردهای متعددی دارند. تاکنون حامل‌های متعددی توسعه یافته‌اند تا بتوان پروتئین‌ها را در مقادیر زیاد تولید نمود. کارآمدترین حامل‌ها، آنهایی هستند که باعث بیان حداکثری پروتئین‌ها در باکتری‌ها می‌شوند؛ زیرا باکتری‌ها می‌توانند به راحتی و در کوتاه‌ترین زمان با بالاترین دانسیته سلولی تکثیر شوند. با این وجود نیاز به حداکثر بیان در سلول‌های یوکاریوتی نیز از اهمیت خاص خود برخوردار می‌باشد زیرا بسیاری از پروتئین‌ها باید به طرز صحیحی تا خوردگی یافته و تغییرات پس از ترجمه‌ای ویژه یوکاریوت‌ها را به دست آورند تا از نظر بیولوژیکی فعال باشند. برای حداکثر بیان پروتئین نو ترکیب در سلول‌های یوکاریوتی می‌توان از کاست‌های بیان ژن که در جایگاه‌های خاصی از ژنوم سلول‌های هدف الحاق می‌گردد، استفاده نمود تا بدین ترتیب امکان بیان پایدار و بلند مدت ژن مورد نظر را خواهد داشت. به همین منظور سامانه‌های الحاق هدفمند به ژنوم، بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (۱۱). در این تحقیق جهت الحاق حامل نو ترکیب pDB2/Tenecteplase به ژنوم از آنزیم اینتگرز فاژ ϕ C31 که یک رکامیناز با جایگاه اثر اختصاصی می‌باشد و در سلول‌های پستانداران به شکل موثری عمل می‌نماید استفاده گردید. این اینتگرز می‌تواند حامل حاوی جایگاه attB را به شکل یک طرفه و برگشت‌ناپذیر در تعداد مشخصی از جایگاه‌های Pseudo attP موجود در ژنوم سلول میزبان الحاق نماید. باید توجه داشت که عملکرد اینتگرز در الحاق حامل مذکور در ژنوم نه تنها به وجود جایگاه‌های Pseudo attP بستگی دارد بلکه به ویژگی‌های کروماتین در محل الحاق نیز وابسته است به طوری که الحاق در جایگاه‌هایی در ژنوم صورت می‌پذیرد که کروماتین دارای یک کانفورماسیون باز باشد و ژنوم جهت الحاق در دسترس قرار دارد؛ یعنی در نواحی Euchromatin که برای بیان ژن از مزیت بیشتری نسبت به مناطق Heterochromatin برخوردار می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود بیان ژن مورد نظر در این حالت به میزان قابل توجه و به شکل مداوم صورت پذیرد (۱۲).

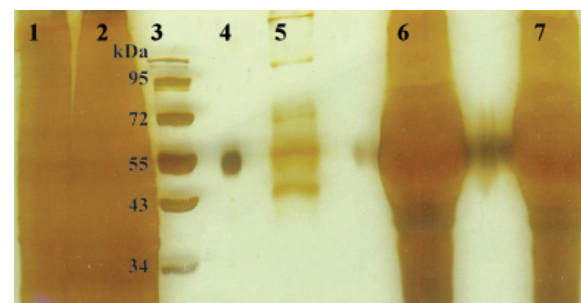
سال‌هاست که فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) در کلینیک به عنوان یک داروی مؤثر مورد استفاده قرار

بررسی فعالیت آنزیم ترشح شده توسط سلول‌های CHO نو ترکیب در محیط کشت

جهت بررسی و اثبات تولید و ترشح پروتئین Tenecteplase در محیط کشت، آزمون الکتروفورز عمودی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام گرفت و از ژل Resolving ۱۲ درصد استفاده گردید (شکل ۶). جزئیات این الکتروفورز در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۵: نشان دهنده نتایج واکنش PCR بر روی ژنوم سلول ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده است. با توجه به مشاهده قطعه تکثیر شده با اندازه مورد نظر و عدم وجود آن در نمونه کنترل منفی، حاکی از الحاق این قطعه درون ژنوم سلول‌های CHO به صورت پایدار می‌باشد.



شکل ۶: ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی نمونه‌های مورد آزمایش (جدول ۱) رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره است. ستون ۳ molecular size mark -er و ستون ۵ نشان دهنده نمونه خالص شده توسط FPLC است.

در ضمن با استفاده از آزمون Western Blot با آنتی‌بادی اندازه پروتئین فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نو ترکیب که در حدود ۶۲ تا ۶۵ کیلو دالتون می‌باشد، اندازه باند مشاهده شده صحیح به نظر می‌رسد. با توجه اطلاعات موجود مبنی بر برش Tenecteplase در محیط کشت توسط پروتئازهای ترشح از سلول‌های CHO، قطعه بریده شده با اندازه حدود ۳۹ کیلو دالتون که حاوی اپی توپ اختصاصی آنتی‌بادی اولیه می‌باشد نیز در تصویر مشاهده می‌گردد (شکل ۷).

فعالیت Tenecteplase مترشح از سلول‌های CHO نو ترکیب نیز بررسی گردید و همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، تفاوت جذب مربوط به محیط کشت سلول‌های CHO ترانسفکت نشده و ترانسفکت شده را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه این سوبسترا توسط هر سرین پروتئاز که در سرم وجود داشته باشد، هیدرولیز شده و در

G418، میزان فعالیت کلون‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی محل دقیق الحاق سامانه اینتگرز فاژ ϕ C31 به ژنوم با تعیین توالی ژنوم مشخص شود تا از نظر مولکولی نیز صحت عملکرد سامانه الحاق اینتگرز فاژ ϕ C31 مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

سامانه اینتگرز فاژ ϕ C31 جهت بیان Tenecteplase به شکل مداوم در سلول‌های CHO قابل استفاده می‌باشد که در مطالعه حاضر رده پایدار سلولی تولید کننده Tenecteplase برای اولین بار در ایران تهیه گردید.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های این مطالعه توسط پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

References

1. Patthy L, Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*. 1985; 41(3): 657-663.
2. Collen D, Topol EJ, Tiefenbrunn AJ, Gold HK, Weisfeldt M L, Sobel BE, et al. Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 1984; 70: 1012-1017.
3. Bennett WF, Paoni NF, Keyt BA, Botstein D, Jones A, Presta L, et al. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 5191-5201.
4. Topol EJ, Califf RM, George BS, Kereiakes DJ, Lee KL. Insights derived from the thrombolysis and angioplasty in myocardial infarction (TAMI) trials. *J Am Coll Cardiol*. 1988; 12(6 Suppl A): 24A-31A.
5. Keyt BA, Paoni NF, Refino CJ, Berleau L, Nguyen H, Chow A, et al. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(9): 3670-3674.
6. Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕ iC31 integrase. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(12): 3926-3934.

می‌گیرد. این آنزیم برای آغاز یا تسهیل فرایند انحلال لخته (فیبرینولیز) ضروری است. با توجه به تجربیات به دست آمده در مورد الحاق هدف‌مند با استفاده از سامانه اینتگرز فاژ ϕ C31 تصمیم گرفته شد تا به کمک این سامانه توالی بیان کننده Tenecteplase به ژنوم سلول‌های CHO الحاق شود که این مساله برای اولین بار محقق گردید و رده‌های خالص به دست آمده از طریق غربال‌گری با آنتی‌بیوتیک، بیان قابل توجهی را در مقایسه با سلول ترانسفکت نشده نشان دادند. Tenecteplase یک داروی موثر در درمان نارسایی‌های انسداد عروق با منشأ ترومبوتیک می‌باشد (۴-۲). ابتدا توالی کدکننده Tenecteplase تولید گردید و پس از تایید توالی قطعه کدکننده مذکور با کلون کردن آن در حامل بیانی pDB2، این حامل نو ترکیب به همراه حامل pCMV-Int - که بیان کننده آنزیم اینتگرز می‌باشد - برای ترانسفکت کردن سلول‌های CHO مورد استفاده قرار گرفت. پس از انتخاب کلون‌های نو ترکیب به کمک آنتی‌بیوتیک

7. Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(11): 5995-6000.
8. Calos MP. The ϕ iC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2006; 6(6): 633-645.
9. Hollis RP, Stoll SM, Scimenti CR, Lin J, Chen-Tsai Y and Calos MP. Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 79.
10. Keravala A, Portlock JL, Nash JA, Vitrant DG, Robins PD, Calos MP. ϕ iC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. *J Gene Med*. 2006; 8(8): 1008-1017.
11. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2004; 22(11): 1393-1398.
12. Thyagarajan B, Calos MP. Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. In: Smales CM, James DC, (eds). *Methods in Molecular Biology*, Totowa: Humana Press Inc; 2005; 308.